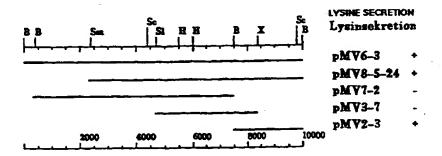
# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

## INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:	-	(11	1) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/23597
C12N	A2	(43	8) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Juli 1997 (03.07.97).
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Decen		96	(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 195 48 222.0 22. December 1995 (22.12.)	9 <b>5</b> ) 1	DΈ	Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten auss FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE).	er U [DE/D	S): E];	· -
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VRLIJC, Marina Steinstrasser Allee 60, D-52428 Jülich (DE). EG Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, D-52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 52428 Jülich (DE).	GELIN ich (D	IG, E).	
(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZI JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, Jülich (DE).			
(\$4) Title: DPOCESS FOR THE MICRORIAL PRODUC	TION	OF A	MINO ACIDS BY BOOSTED ACTIVITY OF EXPORT CARRIERS

(54) Bezeichnung: VERFÄHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DURCH GESTEIGERTE AK-TIVITÄT VON EXPORTCARRIERN



#### (57) Abstract

The invention pertains to a process for the microbial production of amino acids. The process in question involves boosting the export carrier activity and/or export gene expression of a micro-organism which produces the desired amino acid. According to the invention, it was found that a single specific gene is responsible for the export of a given amino acid, and on that basis a process for the microbial production of amino acids, involving the controlled boosting of the export gene expression and/or export carrier activity of a micro-organism which produces the amino acid in question, has been developed for the first time. The boosted expression or activity of the export carrier resulting from this process increases the secretion rate and thus increases transport of the desired amino acid.

### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrieraktivität und/oder die Exportgenexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgenexpression und/oder die Exportcarrieraktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Secretionsrate, so daß der Transport der entsprechenden Aminosäure erhöht ist.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	America	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Meziko
AT	Osterreich	GE	Georgies	NE	Niger
ΑÜ	Ameratica	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	Bru	Ungarn	NZ	Neuscland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL.	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Beain	JP	Japan	RO	Rumanien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
OF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	ū	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI.	Cite d'Ivoire	ĹX.	Sri Lanks	SN	Senegal
CM	Kamerus	LR.	Liberia	SZ	Swasiland
-	China	i i k	Litzuen	TD	Technol
CN	Tachechoslowakei	ū	Locarbure	TG	Togo
cs		LV	Lettland	TJ	Tadachikistan
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DE	Deutschland		Republik Moldau	ÜA	Ukraine
DK	Dinemark	MD MG	-	UG	Uganda
EE	Estland		Madagaskar Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanies	ML		UZ	Usbekistan
F	Finalisad	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FR	Prankreich	MR	Mauretanien	*14	A Minimum
GA	Gabon	MW	Malswi		

Beschreibung

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren 5 durch gesteigerte Aktivität von Exportcarriern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Her-stellung von Aminosäuren gemäß den Ansprüchen 1 bis 20, Ex-portgene nach Ansprüch 21 bis 26, Regulatorgene nach Ansprüch 27 und 28, Genstrukturen gemäß den Ansprüchen 29 und 30, Vektoren nach Ansprüch 31 bis 33, transformierte Zellen nach Ansprüch 34 bis 40, Membranproteine gemäß Ansprüch 41 und 42 sowie Verwendungen nach Ansprüch 43 bis 48.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin, wie auch L-Threonin, und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament, oder L-Glutamat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

25

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B. Corynebacterium glutamicum und seine Verwandten ssp. flavum und ssp. lactofermentum (Liebl et al., Int J System Bacteriol

(1991) 41:255-260) wie auch Escherichia coli und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüßigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung 10 durch Ausschaltung der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Threoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849 20 B1, UK Patent Application GB 2 152 509 A).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 124375/1986, EP 0 488 424). Darüber hinaus wurden auch durch Überexpres-

sion von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese codieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Threoninbildung erreicht (EP 0 436 886 A1).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion\_ zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulä-10 ren Primär-metabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin, oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463 A2). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosāuren (EP 0 3331 145).

Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Als eine weitere Limitation kommt grundsätzlich aber auch der Export der im Zellinneren gebildeten Aminosäuren ins Kulturmedium in Be-tracht. Daher gibt es 25 vereinzelte Ansätze, diesen Export und damit die Wirtschaftlichkeit der Aminosäureproduktion zu verbessern. So hat man die Zellpermeabilität bei Coryne-bacterium durch Biotinmangel, Detergenz- oder Penicillinbehandlung erhöht. Diese Ausschleusehilfen waren jedoch aus-30 schließlich bei der Glutamatproduktion erfolgreich, während die Synthese anderer Aminosäuren auf diese Weise nicht verbessert werden konnte. Auch sind Bakterienstämme entwickelt worden, bei denen die Aktivität des

Sekretionssystems aufgrund chemischer oder physikalischer Mutation erhöht ist. Es wurde dadurch beispielsweise ein Corynebacterium glutamicum-Stamm erhalten, der sich durch eine verbesserte Sekretionsaktivität insbesondere für die L-Lysinproduktion eignet (DE 42 03 320).

Insgesamt zeichnen sich alle bisher durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Sekretion zellintern gebildeter -Aminosāuren dadurch aus, daß ein erhöhter Efflux von 10 Aminosäuren aufgrund der gewählten ungerichteten bzw. unspezifischen Methoden nur durch Zufall erreicht werden konnte. Einzig in der Deutschen Patentanmeldung No. 195 23 279.8-41 ist ein Verfahren beschrieben, das es erlaubt, die Sekretion zellintern gebildeter Aminosäu-15 ren ganz gezielt zu erhöhen, indem die Expression von für den Import von Aminosäuren kodierenden Genen erhöht wurde. Die dieser Vorgehensweise zugrundeliegende Erkenntnis, daß die Zelle Importproteine für den Export von Aminosäuren verwendet wie auch die Tatsache, daß 20 Mikroorganismen von Natur aus keine überschüssigen Aminosäuren bilden und ausscheiden, legt die Vermutung nahe, daß für den Aminosäuretransport spezifische Exportgene bzw. -proteine gar nicht existieren, sondern daß aus der Zelle die Aminosauren über andere Exportsysteme 25 exkretiert werden.

Die bisher bekannten Exportsysteme exportieren giftige Metallionen, toxische Antibiotika und höhermolekulare Toxine. Diese Exportsysteme sind relativ komplex aufgebaut: In der Regel sind Membranproteine der Cytoplasmamembran beteiligt, die jedoch nur eine Teilreaktion des Exports bewirken, so daß vermutlich für den Transport zusätzliche, extracytoplasmatische Hilfsproteine erfor-

20

25

30

derlich sind (Dinh, T. et al., A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1994, 176: 3825-3831). Des weiteren ist bekannt, daß bei dem sec-abhängigen Exportsystem für extrazelluläre Proteine mindestens 6 verschiedene Proteinkomponenten für den Export essentiell sind. Dieser Stand der Technik legt die Vermutung nahe, daß ebenso die für den Export von Aminosäuren zuständigen, aber bislang unbekannten Systeme aus mehreren Proteinkomponenten bestehen bzw. mehrere Gene für den Export von Aminosäuren zuständig sind. Hinweis dafür könnten die von Vrljic et al. beschriebenen (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) verschiedenen, im Lysinexport defekten Mutanten sein.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgen-Expression und/oder die Exportcarrier-Aktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Export der entsprechenden Aminosäure erhöht ist. Auch akkumulieren derart veränderte Mikroorganismen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure im Kulturmedium.

Zur Erhöhung der Exportcarrier-Aktivität wird insbesondere die endogene Aktivität eines Aminosäureproduzierenden Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung

der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikationen oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene Exportcarrier-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen Exportgens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

10

15

20

25

30

Die Exportgen-Expression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Exportgen-Expression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflußung eines dem Exportgen zugeordneten Regulatorgens erfolgen, wie weiter unten ausgeführt wird. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

30

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Exportgen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, vorzugsweise in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Die regulatorischen Gensequenzen weisen insbesondere eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz bzw. eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz auf. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution (en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei aber die Regulatorprotein-Aktivität bzw. -Funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist: So kann durch Mutation der regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung des Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Exportgens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Des weiteren können dem Exportgen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Exportgen-Expression bewirken.

Für den Einbau des Exportgens in ein Genkonstrukt wird das Exportgen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung Corynebacterium isoliert, und mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismen-Stamm, insbesondere Corynebacterium, transformiert. Die Iso-

lierung und Transformation des entsprechenden Transportgens erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle der Isolierung und Klonierung eines Transportgens aus Corynebacterium eignet sich beispielsweise die Methode der homologen Komplementation einer exportdefekten Mutante (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Falls keine direkte Klonierung des Strukturgens möglich ist, kann zunächst auch die Insertion von Vektorsequenzen in das Transportgen erfolgen, um es dann über "plasmidrescue"in Form inaktiver Fragmente zu isolieren. Für 10 das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus C. glutamicum ATCC 13032 oder C. glutamicum ssp. flavum ATCC 14067 oder auch C. glutamicum ssp. lactofermentum ATCC 13869. Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren 15 (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688; Gene 102 (1991) 93-98), erfolgt die Transformation in die Aminosäureproduzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al. (1989) FEMS Microbiol Lett 65: 299-304) oder Konjugation (Schäfer et al. (1990) J Bacteriol 172: 1663-20 1666). Für die Übertragung werden vorzugsweise Vektoren mit niedriger Kopienzahl eingesetzt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäuren dereguliert sind und/oder die einen erhöhten Anteil 25 an Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten.

Nach Isolierung sind Exportgene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweisen. Auch hier umfassen Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen insbe-

sondere funktionelle Derivate im oben für die regulatorischen Sequenzen angegebenen Sinne. Diese Exportgene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

5

25

30

Dem Exportgen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

10 ist

Durch Klonierung von Exportgenen sind Plasmide bzw.

Vektoren erhältlich, die das Exportgen enthalten und wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines

Aminosäure-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von Corynebacterium
handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h.
in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die

Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen
Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Es sind eine Vielzahl von Sequenzen bekannt, die für Membran-proteine unbekannter Funktion kodieren. Durch die erfindungs-gemäße Bereitstellung von Exportgenen, wie beispielsweise des Exportgens mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2, bzw. der entsprechenden Exportproteine, wie z.B. das mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 1, können nunmehr Membranproteine, deren Funktion der Transport von Aminosäuren ist, durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Das damit identifizierte Exportgen kann anschlie-

ßend zur Verbesserung der Aminosäureproduktion nach dem erfin-dungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Membranproteine be-sitzen in der Regel 12, zum Teil auch 4 transmembrane Helices. Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß die für den Export von Aminosäuren zuständigen bzw. geeigneten Membranproteine 6 transmembrane Helices aufweisen (vgl. z.B. die in Tabelle 3 aufgeführte Aminosäuresequenz eines Exportproteins, bei der die 6 transmembranen Bereiche durch Unterstreichen kenntlich gemacht sind). Damit liegt hier eine bisher noch nicht beschriebene und somit neue Klasse von Membranproteinen vor.

15

10

#### Ausführungsbeispiele

a) Klonierung eines Exportgens und Klonierung eines Regulators aus Corynebacterium glutamicum

20

30

Chromosomale DNA aus C. glutamicum R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) wurde, wie bei Scharzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) beschrieben, aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch auf ihre Größe hin analysiert und die Fraktion mit einer Fragmentgröße von etwa 6-10 kb zur Ligation mit dem Vektor pJC1 eingesetzt. Dazu wurde der Vektor pJC1 mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurde mit 20 ng der chromosomalen 6-10 kb Fragmente ligiert. Mit dem gesamten Ligations-

ansatz wurde die exportdefekte Mutante NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) durch Elektroporation (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) transformiert. Die Transformanten wurden auf LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) mit 15  $\mu$ g Kanamycin pro ml selektioniert. Diese Transformanten wurden umfangreichen Plasmidanalysen unterzogen, indem 200 der insgesamt 4500 erhaltenen Klone einzeln angezogen, und deren Plasmidanteil, und -größe bestimmt wurden. Im Durchschnitt trug etwa die Hälfte der untersuchten Kanamycin-resistenten Klone ein rekombinantes Plasmid mit einem Insert der durchschnittlichen Größe von 8 kb. Damit ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 0,96 für die Anwesenheit jedes x-beliebigen Gens aus C. qlutamicum in der errichteten Genbank. Die 4500 erhaltenen Trans-15 formanten wurden alle einzeln auf Wiedererhalt der Lysinsekretion geprüft. Dazu wurde das von Vrljic beschriebene System zur Induktion der L-Lysinausscheidung in Corynebacterium glutamicum eingesetzt (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Dazu wurden sogenannte Minimal-20 medium-Indikatorplatten hergestellt, die pro Liter 20 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 5 g Harnstoff, 1 g  $KH_2PO_4$ , 1 g  $K_2HPO_4$ , 0,25 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 42 g Morpholinopropansulfonsaure, 1 ml CaCl<sub>2</sub> (1 g/100 ml), 750 ml dest., 1ml Cq Spuren-salze, 1 ml Biotin (20 mg/100 ml), pH7, 4 % Glukose 1,8 mg Protokatechusäure, 1 mg FeSO $_4$  x 7 H $_2$ O, 1 mg  $MnSO_4 \times H_2O$ , 0,1 mg  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ , 0,02 mg  $CuSO_4$ ,  $0.002 \text{ mg NiCl}_2 6 \text{ H}_2\text{O}, 20 \text{ g Agar-Aqar, sowie } 10^7 \text{ Zel-}$ len/ml der Lysin-auxotrophen C. glutamicum Mutante 49/3 enthielten. Die ursprünglichen 4500 Transformanten wurden alle einzeln mittels Zahnstocher auf die Indikatorplatten gepickt, mit jeweils einer Kontrolle des ursprünglichen Nichtausscheiders NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) und des Ausgangsstammes R127. Parallel

wurden jeweils 2 Platten beimpft, von denen nur eine zusätzlich 5 mM L-Methionin enthielt, um so die Lysin-ausscheidung zu induzieren. Die Indikatorplatten wurden bei 30 °C inkubiert, und nach 15, 24 und 48 Stunden untersucht. Insgesamt wurden so 29 Klone erhalten, die auf der mit Methionin versetzten Indikator-platte einen Wachstumshof durch den Indikationsstamms 49/3 zeigten. Die Klone wurden vereinzelt, und dann erneut, wie oben beschrieben, auf Wiedererhalt des Wachstumshofs geprüft. Auf diese Weise wurden die zwei Klone NA8 pMV8-5-24 und NA8 pMV6-3 erhalten, die die Fähigkeit wiedererhalten hatten, Lysin auszuscheiden.

Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, durchgeführt. Durch Retransformation in NA8 wurde der plasmidgebundene Effekt der Auscheidung von L-Lysin bestätigt. Beide Plasmide wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Plasmid pMV8-5-24 trägt ein Insert von 8,3 kb, und pMV6-3 eines von 9,5 kb. Die physikalische Kartierung der Inserts zeigt Figur 1.

b) Subklonierung eines DNA-Fragments, das den Lysinexport rekonstituiert

25

30

10

Vom Insert des Plasmids pMV6-3 wurden unter Nutzung der bestimmten Restriktionsschnittstellen einzelne Subklone hergestellt. So wurde das 3,7 kb XhoI-SalI-Fragment, das 2,3 kb BamHI-Fragment und das 7,2 kb BamHI-Fragment mit dem entsprechend geschnittenem und behandeltem Vektor pJC1 (Mol Gen Genet (1990) 220: 478-480) ligiert. Mit den Ligationsprodukten wurde direkt C. glutamicum NA8 transformiert, die Transformanten wie oben beschrieben auf Wiedererhalt der Lysinausscheidung ge-

prüft und die Anwesenheit des Subklons durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse bestätigt. Auf diese Weise wurde als kleinster Subklon der Stamm mit Plasmid pMV2-3 erhalten (Figur 1). Dieses, den Lysinexport vermittelnde Fragment enthält als Insert das 2,3 kb BamHI-Fragment aus pMV6-3.

c) Sequenz des Lysinexportgens lysE und dessen Regulators lysG

10

20

25

Die Nukleotidsequenz des 2,3 kb BamHI-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. durchqeführt (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463-5467), und die Sequenziereaktionen mit dem Auto-Read Sequencing kit von Pharmacia (Uppsala, Sweden). Die elektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Flureszenz DNA Sequenziergerät (A.L.F.) von Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, USA). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Nukleotidsequenz und das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Analyse ergibt zwei vollständige offene Leseraster (ORF) auf dem sequenzierten DNA-Stück. ORF1 kodiert für ein Protein mit einer Länge von 236 Aminosäuren, ORF2 für eins mit einer Länge von 290 Aminosäuren. Das von ORF1 abgeleitete Protein zeigt eine Häufung hydrophober Aminosauren, wie sie für membranständige Proteine charakteristisch ist. Die detaillierte Analyse der Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren mit dem Programm PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521-533) ist in Tabelle 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß das Protein sechs hydrophobe Helixbereiche enthält, die die Membran durchqueren. Damit handelt es sich bei die-

sem Protein um den gesuchten Exporter der Aminosäure L-Lysin. Das entsprechende Gen wird deswegen im Folgenden als lysE bezeichnet. Es ist entsprechend in Tabelle 2 markiert. ORF2 wird in Gegenrichtung zu ORF1 transkribiert. Die Sequenzanalyse zeigt, daß ORF2 hohe Identität mit Regulatorgenen hat, die als eine Familie zusammengefaßt werden (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Gene dieser Familie regulieren die Expression der verschiedensten an katabolen oder anabolen Prozessen beteiligter Gene in positiver Weise. Im Folgenden wird 10 ORF2 deswegen als lysG (Govern = Regulieren) bezeichnet. Wegen dieser Zuordnung, und weil lysE nur zusammen mit lysG kloniert (siehe a)) und subkloniert werden konnte (siehe b)), ist lysG Regulator von lysE und somit ebenfalls am Lysinexport beteiligt. Das Gen lysG und dessen abgeleitete Aminosauresequenz sind ebenfalls in Tabelle 2 bzw. Tabelle 1 gezeigt.

d) Identifizierung eines unbekannten Membranproteins 20 aus Escherichia coli durch Sequenzvergleich

Mit den etablierten Sequenzen gemäß Tabelle 3 können bereits existierende Sequenzbanken durchsucht werden, um so den von sequenzierten Bereichen abgeleiteten Proteinen eine Funktion zuzuordnen. Entsprechend wurde die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus C. glutamicum unter Zuhilfenahme des Programmpakets HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) mit abgeleiteten Protein-Sequenzen aller dort deponierten DNA-Sequenzen verglichen. Zu einer einzigen Sequenz bisher unbekannter Funktion aus E. coli ergab sich eine hohe Homologie von 39,3 % identischen Aminosäuren, und 64,9 % ähnlichen Aminosäuren. Der Vergleich ist in Figur 2 gezeigt. Das bislang nicht charakterisierte offe-

30

ne Leseraster aus E. coli ist über dieses Verfahren damit als ein Aminosäureexportgen identifiziert.

e) Gesteigerter Export intrazellulär akkumulierten L-5 Lysins

Der Stamm C. glutamicum NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) wurde mit Plasmid pMV2-3 transformiert, und die L-Lysinausscheidung der Stämme verglichen. Dazu wurden NA8 und NA8pMV2-3 in Komplexmedium wie bei 10 Vrljic et al. (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) beschrieben angezogen, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) jeweils getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 5 mM L-Methionin, um die intrazelluläre L-Lysinbiosynthese zu 15 induzieren. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 30 °C auf dem Rotationsschüttler bei 140 Upm wurde zellinterne und externe L-Lysinbestimmungen durchgeführt. Zur zellinternen Bestimmung wurden Silikonölzentrifugatio-20 nen durchgeführt (Methods Enzymology LV (1979) 547-567); die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatografie (J Chromat (1983) 266: 471-482). Diese Bestimmungen wurden zu verschiedenen Zeiten, wie in Figur 3 angegeben, durchgeführt. Entsprechend dem benutzten Verfahren wird das angestaute 25 zellinterne L-Lysin also durch pMV2-3 vermehrt ausgeschieden und akkumuliert. Entsprechend ist erwartungsgemäß auch das zellintern vorhandene L-Lysins stark reduziert. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und 30 beschriebenen Exporters ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

f) Gesteigerte Akkumulation von L-Lysin durch lysE oder lysEG

Vom Subclon pMV2-3, der das sequenzierte 2374 bp BamHI-Fragment in pJC1 enthält (siehe Figur 1), wurde entsprechend der Sequenzinformation das lysE tragende 1173 bp PvuII-HindII Fragment in p21 (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688) ligiert, und so das Plasmid plysE erhalten. Dieses Plasmid, sowie das lysElysG tragende Plasmid pMV2-3 wurde durch Elektroporation in C. glutamicum Stamm d eingeführt, indem chromosomale Bereiche deletiert sind. Die erhaltenen Stämme C. 10 glutamicum d pMV2-3. C. glutamicum d plysE, C. glutamicum pJCl wurden wie unter e) beschrieben zunächst auf Komplexmedium vorgezogen, dann in Produktionsminimalmedium CGXII zusammen mit 4% Glukose und 5 mM L-Methionin kultiviert, und Proben zur Bestimmung des 15 akkumulierten L-Lysins entnommen. Wie aus Figur 4 ersichtlich, wird durch lysElysG eine Steigerung der Lysinakkumulation gegenüber der Kontrolle erreicht. Die plysE wird durch dieses Verfahren eine außerordentlich gesteigerte Akkumulation von 4,8 auf 13,2 mM L-lysin 20 erreicht.

Legenden der Tabellen und Figuren:

Tabelle 1: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporter-Regulators aus Corynebacterium glutamicum, mit dem für DNA-bindende Proteine typischen Helix-Turn-Helix Motif.

Tabelle 2 (drei Seiten): Die Nukleotidsequenz des für den Lysinexporter und Lysinexport-Regulators codieren10 den Bereichs aus C. glutamicum.

Tabelle 3: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus Corynebacterium glutamicum, mit den identifizierten transmembranen Helices TMH1 bis TMH6.

Figur 1: Die durch die Klonierung erhaltenen DNA-Fragmente in pMV6-3 und pMV8-5-24, die die Lysinsekretion bewirken, sowie der aus pMV6-3 hergestellte Subklon pMV2-3, der ebenfalls die Lysinsekretion bewirkt und sequenziert wurde.B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; Sl, SalI;H, HindII; X, XhoI.

Figur 2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von LysE aus C. glutamicum (oben), mit einem Genprodukt bislang unbekannter Funktion aus Escherichi coli (unten), das dadurch als Exportcarrier identifiziert ist.

Figur 3: Gesteigerter Lysinexport durch pMV2-3 mit C. glutamicum NA8. Oben, die Kontrolle mit geringer Ausscheidung und zellinternem Anstau von Lysin bis etwa 150 mM. Unten die durch pMV2-3 bewirkte hohe Ausscheidung mit zellinternem nur geringem Anstau von etwa 30 mM.

18

Figur 4: Die Steigerung der Lysinakkumulation in C. glutamicum durch lysElysG (pMV2-3) (mittlere Kurve), und die durch lysE (plysE) bedingte Akkumulation (obere Kurve).

	ם מיז הפוי:	VECTABLIAN	NVWO TENDO	98.531669. VACTIAAISA SRIAMONWVM GEGIRAII 120	ת ר
APMLKAGEVI	GWGLLPETQA	GFGEAIRRGL,	DGRVDGPVGR RRVSIVPSAE GFGEAIRRGL GWGLLPETQA APMLKAGEVI	DGRVDGPVGR	201
PKDVLQDRDL	MAAMPVLRFG	DAYMVDGKLD	CEVVELGIMR HLAIATPSLR DAYMVDGKLD WAAMPVLRFG PKDVLQDRDL	CEVVELGTMR	151
VTREANPVAG	LLRRGDVLGA	RLEDEAHTLS	ASWGGATLTL	101 TWFPPVFNEV ASWGGATLTL RLEDEAHTLS LLRRGDVLGA VTREANPVAG	101
TIAINADSLS	LSGRLAEIPL	VLLQAETKAQ	TQPAKATEAG EVLVQAARKM VLLQAETKAQ LSGRLAEIPL TIAINADSLS	TQPAKATEAG	51
	Helix-Turn-Helix-Motiv	Helix-Turn-			
HHVGRVLVSR	AVSQRVKALE	ASLALSISPS	SIIDEGSFEG	1 MNPIQLDTLL SIIDEGSFEG ASLALSISPS AVSQRVKALE HHVGRVLVSR	

Tabelle 1

•			•				•			•	ysG	-L	•				٠		
CG	rgco	rgc:	AGT'	CGT	GA(	'AA(	AGC'	GGG.	TTA	GCG'	CCG	ATT	TTG	TCA	TCT	AAG	GAA	TTG	AC
A	V	V	D	A	A	I	E	G	L	R	P	-							
		n >		~~~			- ~m».	COC.	m~~		~m3	~>~		<b></b>		~ > m		~> ~	
CA.													CTA						
Т	P	M	Y	W	Q	K	W	R	L	E	5	R	S	L	A	R	ъ	T	D
AC.	CGA	CGT	CCT(	TAC	rcg:	AA!	CGA	GGA	AGA	TGA.	TAG	TCC	TCC'	AGC	AGT	TAG	CCA	TAC	AGT
Q	A	A	P	M	L	K	A	G	E	V	I	L	L	D	E	I	P	I	D
•			•										. •						
CG	AGG	3GA2	TTY	GGT'	GTY	GG	TAA	GCT	GCC	GGA	TCC	GGT	GTT	GGG	TCA	TCT	CCT	AGC	CAA
A	E	G	F	G	E	A	I	R	R	G	L	G	W	G	L	L	P	E	T
MG	ኮረሳ:	אככי	260:	تحت	וינירי	ر درس	ርርጥ	<b>ጉ</b> ጉ	ጥርጥ	CCC	CCC	CAC	GCG	ጥርር	איזיי	ጥክሶ	സമസ	ccc	∽π∨∽
D	L	D	G G		V				v				R		S	I	V		S
_	_	_	_		•		Ĭ.		•				••	•	-	_	•	•	_
TC	AGA'	GTT.	CGG	CGT	rag(	CG'	TGC	TTC	GCA	TTC	GGC	CCT	AAC	AGA	TGT	TCG	ACT	AGA	GCC
L	D	W	A					L					K						
			•																
TA	GCG <sup>(</sup>	ACC	TTC	CGG	rac:	CGT	CAA	CCC	CTC	TTA	GCG	AGG	CGT	ATC	TAC	TGG	AGT	GGT	AAG
M	R	Н	L	A	I	A	T	P	S	L	R	D	A	Y	M	V	Ð	G	K
	~~~	maa		~~~	<b>.</b>						~~~		:						
ىى G	CGA A	TGG V	CAA T	GCC R	AGT E	.GA A		P					AGT					_	
G	A	V	1	К	E,	A	IA	P	V	A	G	С	E	V	V	E	L	G	T
CA	TCG	GCG	TTC	AGG	AGA	AGT	CGA	ACG	CAC	TTA	CTA	TTC	TCG	GCG	'GCG	GGT.	AGA	MC4	لملمك
T	Ļ	R	L	E	D		A						L			G		v	
	•														•			·	_
TC	СТА	CAC	GTA	TIG	CCT	CCT	TGC	TTC	AAC	AGC	TGG	CGA	CTT	GTI	'GGG	GGT	CGA	CAA	TCC
L	S	T	W	F	P	P	V	F	N	E	V	A	S	W	G	G	A	T	L
CG	እሮር	TCA	ሃግጥ አ	CCT	CCR	mcc		N (20)	י גיווא		mmo				·m > c				
													I	.C.GC	. I AL	.AAC	70.00	AUA D	ru Tij
	Ψ.	_	J	J			A	15	_	F	ם	•	1	A	_	14	A	Ъ	5
CG	GGG	AGT	TGA	TCC	TGI	ACG	CG?	3CG2	GCC	AAC	TAA	TGG	TTG	TCG	ACC	LCG?	LAGA	CAZ	LAA!
A	G	E	V	L	V	Q	A	A	R	K	M	V	L	L	Q	A	E	T	K
יאטיי	:אכיר	ነልሮር	የጋልግ	ביוויביר	CC.	CCu	י י ביא <b>ר:</b>	ململت	ሳሌ ጎ	دىلىك	יכיי	·^^	AACC	גייטיי	,,,,,,	አኮር		· / · · ·	<b>N</b> -C-
		77	1 T T			· · · · ·	GF	L				.CMU	wee	-C-F	ـ ب	WW	LUGA	-CM	110

Tabelle 2

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	960
<pre><lysg **ttcgacggaagtagttactaactctcgtttcacaggtcaacttaccccaagta5<="" pre=""></lysg></pre>	
5'TGCCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT	
F S G E D I I S L L T D L Q I P N M	
	1020
ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTACTTAAGTACTTCCATAGGTCACG <b>ATG</b> GT	
M V	
Lyse	>
	1080
GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCTGCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG	
I M E I F I T G L L G A S L L L S I G	
	1140
ACCGCAGAATGTACTGGTGATTAAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTGCGGTTCT	
P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L	<u> </u>
TCTCGTGTGTTTAATTTCTGACGTCTTTTTGTTCATCGCCGCACCTTGGGCGTTGATCT	1200
L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L	
	1260
TTTGTCCAATGCCGCGCCGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT	
LSNAAPIVLDIMRWGGIAYL	
	1320
GTTATGGTTTGCCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAA	
LWFAVMAAKDAMTNKVEAPQ	
	1380
GATCATTGAAGAAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCTTTGGGCGGTTCGGCGGT	1300
I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V	
	1440
GGCCACTGACACGCGCAACCGGGTGCGGGTGGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG	
ATDTRNRVRVEVSVDKQRVW	
	1500
GGTAAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCCGAATGCGTATTTGGA	
V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D	
	1560
CGCGTTTGTGTTTATCGGCGCGTCGGCGCGCGAATACGGCGACACCGGACGCTGGATTTT	1300
A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F	
	1.000
CGCCGCTGGCGCGTTCGCGCCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCGGCGCAGC	1620
A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	1680
AGCATTGTCACGCCCGCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC	
A L S R P L S S P K V W R W I N V V A	

Tabelle 2 (fortgesetzt)

												•							•	1740
														•	orf.			_		
															N					
5 ′	C	CAC	rgg	CGT	AAC	CGG'	rag'	rrr	BAC!	raci	AACI	PAC	CAI	MTC	AAA	AGC	3CC(	CAA. ~	AA ,	
AGTT(	3TG	\TG	ACC	GCA'	TTG	GCC	ATC	AAA(	TG	ATG:	rtga	ATG	GT7	rag:	[-T-1.	reg	افافات	خ	2	
V	J 1	4	r 2	A	L	Α	1	K 1	1 ر	M I			se -							
												Ly	BE 7	7						
		•							•							-			. •	1800
CCTT	AGC	CAC	CGG	AAG	CGG	GTT	TAC	AAC'	rac(	GGC	CCC	AGC	ACC	CTT.	rag.	AGT.	AGC	TAG	CG	
s	D	T	A	K	A	W	I	N	I	G	A	D	н	S	1	E	ט	1	A	
																			_	1860
GAGG'	- المالية	AGC	دود	ልርጥ	بلحلت	ጥጥር፡	AGG	TTC	AAC	AAC'	TCA	CTT.	AGT"	rcc	GAC	AAC	AGG	TCG	AC	
E E	L	E	A	D	s	F	E	L	N	N	L	S	D	L	s	N	D	L	Q	•
_	_					-														1920
GAGT"	m~ »	- -	<del></del>	CCT	ረርጥ የ	ጥልሮ	ጥጥል	ርርጭ	GAC	CAG	TGC	CAT	AGG	CGC	GGC	ATG	AGA	GGA	•	1320
GAGT E	V TGA	5	S	A	G	I	L	A	s	T	v	T	D	A	G	Y	E	G	Q	
	•	_	_	-	_															1980
GAGC	~~~	- mcc	mcc	ረጥ አ	രവ	ጥርር	rcc	ጥልሮ	Acg	CGT	TCA	crg	ACG	GGC	GCA	AGG	ACC	CGC	TA	2300
GAGC E	B B	T.	V	W W	A	L	A	M	0	A	L	ີຣີ	Q	G	R	E	Q	A	I	
		_	•	•••		_	-		_				-							2040
CAGT					·m~~		» <b>С</b> Т	ም አጥ		אמי	ተር ር	מממ	:יייי	ייאר	ccc	AGT	יכידפ	TCC	·CT	2030
CAGT	AAC N	TCG T.	AAC K	R	.TGG V	M	D	I	AAC N	N	v	N	L	M	G	E	S	L	s	
		~	••		•		_													2100
GAAT			~~~		,	•~~т	vece	מסמ	ССП	מ בידיי	CCT	'AGC	יייצייי	ATA	AAC	:AGC	CAC	TCC	TC	2100
GAAT K	G G	ACC	.GAC	.CGC A	.GCC R	S	G	É	P	I	G	D	L	Y	K	D	T	L	L	
10	J	•			-															2160
CGGG	· » ~~	·	איזירי א	CCZ	\ CTPC	- -	ירכיו	<b>ም</b> ልር	'ጥር-ር	<b>الت</b> ات:	rrC1	GGT	''AAC	:AAC	CG	rcg2	ACTO	3AC	TT:	2200
CGGG	ACC Q	LGJ A	T.	P	S	F	A	I	V	G	L	G	N	N	A	A	S	Q	L	
•	¥		_	_	_	-														2220
GTTC	, , , , , ,	. » ~ m		יא כיי	የአርር		ברר ז	, <u>a</u> cc	:acc	:ጥርር	3GT1	rgC'	[AA]	TAC	TA	CT	PAT	CGA.	ACC	
GTTC	.AAC N	E WG 1	G	D D	D	G	P	E	E	v	W	R	N	I	1	s	Y	s	P	
	••	_	_	_	_	-														2280
GACT	~	·	· ·mc·n	BTIC C	~ <b>~</b> ~	~~~~	ccc	באכבר	:DC(	ברכנ	ነፈጥድ	كاملة	GAG'	rcgo	3CG	GAG	GCG	ACA	CTC	
GACI	H	TAC	T.	T.	JCCC P	C	.GG	E	E	A	M	F	E	A	A	E	A	T	L	
¥	••	•	~	_	•	•	_													2340
GAG			~-				DCC/	~m~/	~ > erw	TAIL	TCC(	222	NGC'	יוייטיו	ترد	TTG	ጥጥል	CAG	TGC	
GAG!	ACC: P	)ئىنى: ص	Y.A	۳. ایات ای	101.	T.A.	G G	V	Y	L	A	K	G.	S	A	v	I	D	R	
£	r	G	-	٠	ی	-	_	•	-	_			_							2374
			•			•			•			~	r£3	_		-			-	43/4
GTT		7 N 1771	~m > 4	ግር እ	3 3 C	א א כי	بريشات	ייטיי	ኮሮ ልነ	тас		\ <del>-</del> 0		Г						
GTT7		"HIL	2 I M	بصم	-		911		~~~	~~~~										

Tabelle 2 (fortgesetzt)

TMH3  101 PQIIEETEPT VPDDTPLGGS AVATDTRNRV RVEVSVDKÇR VWVKPMLMAI  151 VLTWLNPNAY LDAFVFIGGV GAQYGDTGRW IEAAGAFAAS LIWFPLVGFG  TMH4  TMH4  TMH5  TMH5
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabelle 3

10

## Patentansprüche

- Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrier-Aktivität und/oder die Exportgen-Expression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die endogene Exportcarrier-Aktivität des Mikroorganismus erhöht wird.
- Verfahren nach Anspruch 2,
   d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
   daß durch Mutation des endogenen Exportgens ein
   Carrier mit höherer Export-Aktivität erzeugt wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
   daß die Genexpression des Exportcarriers durch
  Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
- Verfahren nach Anspruch 4,
   d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
   daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.
  - 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,

daß das Exportgen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl eingebaut wird.

- 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut
  wird, das dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß die regulatorische Gensequenz eine für die in
  Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren
  Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz aufweist.
- 9. Verfahren nach Anspruch 8,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende
  DNA-Sequenz aufweist.
- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9,
  25 dadurch gekennzeich net,
  daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
- 30 11. Verfahren nach Anspruch 10,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.

- 12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß für die Transformation ein Mikroorganismus
  eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der
  entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.
- 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12,
  10 dad urch gekennzeich net,
  daß für die Transformation ein Mikroorganismus
  eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an
  Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
- 15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 13, dad urch gekennzeich net, daß das Exportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung Corynebacterium isoliert wird.
- 20 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da durch gekennzeichnet, daß die Exportgensequenz durch Vergleich mit der Sequenz eines bereits bekannten Exportgens identifiziert wird.
- 16. Verfahren nach Anspruch 15,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß die von der zu identifizierenden Exportgensequenz abgeleitete Aminosäuresequenz mit der in
  Tabelle 3 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen verglichen wird.

- 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
  dadurch gekennzeich durch verstärkung
- daß die Exportgen-Expression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht wird.
  - 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
- dadurch gekennzeichnet,
  daß als Exportgen ein Gen mit einer für die in
  Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren
  Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz
  eingesetzt wird.
- 19. Verfahren nach Anspruch 18,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß als Exportgen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2
  oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNASequenz eingesetzt wird.
  - 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von L-Lysin.
- 25 21. Für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierendes Exportgen.
- 22. Exportgen nach Anspruch 21 mit einer für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
  - 23. Exportgen nach Anspruch 22 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2

25

oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.

- 24. Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 mitdiesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
- 25. Exportgen nach Anspruch 24,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß die regulatorische Gensequenz eine für die in

  Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren
  Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz aufweist.
- 26. Exportgen nach Anspruch 25,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkenden
  DNA-Sequenz aufweist.
  - 27. Zur Regulation eines für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierenden Exportgens geeignetes Regulatorgen mit einer für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
- 28. Regulatorgen nach Anspruch 27 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden
  DNA-Sequenz.
  - 29. Genstruktur, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26.

25

- 30. Genstruktur, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28.
- 31. Vektor, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.
  - 32. Vektor nach Anspruch 31 mit niedriger Kopienzahl.

33. Vektor, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.

- 15 34. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.
- 35. Transformierte Zelle nach Anspruch 34, enthaltend 20 einen Vektor nach Anspruch 31 oder 32.
  - 36. Transformierte Zelle nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung Corynebacterium angehört.
  - 37. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 36,

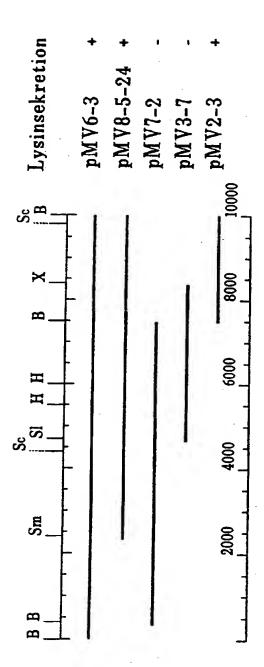
dad urch gekennzeichnet,
daß in dieser die an der Synthese beteiligten Enzyme der Aminosäure, die mittels des Exportcarriers, für das das in die transformierte Zelle
übertragene Exportgen kodiert, aus der Zelle ausgeschleust wird, dereguliert sind.

30

- 38. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 37, dad urch gekennzeich net, daß sie einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
- 39. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.
  - 40. Transformierte Zelle nach Anspruch 39, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 33.
- 15 41. Für den Export von Aminosäuren geeignete Membranproteine mit 6 transmembranen Helices.
- 42. Membranprotein nach Anspruch 41 mit der in Tabelle 3 angegebenen Aminosäuresequenz, wobei Tabelle 3 Bestandteil dieses Anspruches ist.
  - 43. Verwendung eines Exportgens zur Steigerung der Aminosäureproduktion von Mikroorganismen.
- 25 44. Verwendung nach Anspruch 43,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß ein mutiertes Exportgen, das für ein Enzym
  mit erhöhter Exportcarrier-Aktivität kodiert,
  verwendet wird.
  - 45. Verwendung nach Anspruch 43 oder 44,
    d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
    daß der Aminosäure-produzierende Mikroorganismus

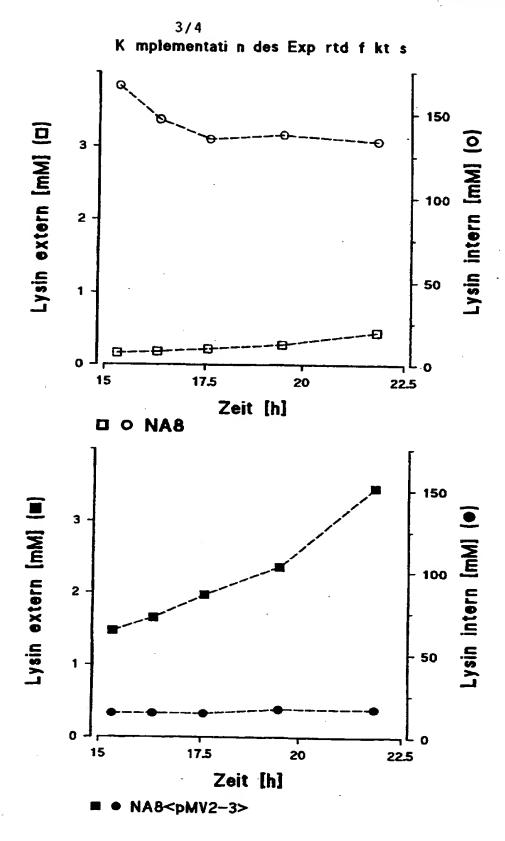
mit einem Genkonstrukt, das ein Exportgen enthält, transformiert wird.

- 46. Verwendung nach Anspruch 45,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische
  Gensequenzen trägt.
- 47. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 46,
  10 dadurch gekennzeichnet,
  daß ein Exportgen aus Corynebacterium verwendet wird.
- Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 47,
  da durch gekennzeichnet,
  daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus
  Corynebacterium verwendet wird.

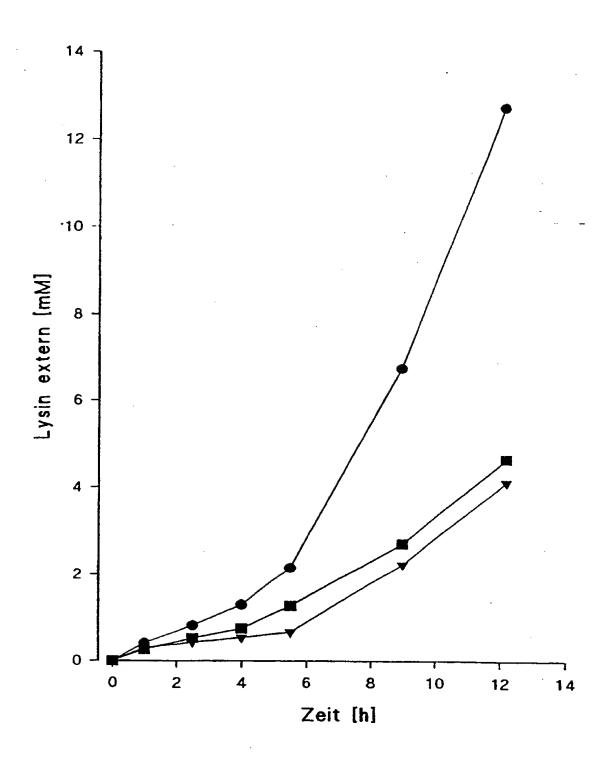


Figur 1

CgLysE	1	MVIMEIFITGLLLGASLLLSIGPQNVLVIKQGIKREGLIAVLLVCLISDV ::   .:	50
EcYgga	1	MILPLGPQNAFVMNQGIRRQYHIMIALLCAISDL	34
CaLysE	51	FLFIAGTLGVDLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA	100
EcYgga	35	VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVAFLLWYGFGAFKTAMSSNIE.	83
CgLysE		POIIEETEPTVPDDTPLGGSAVATDTRNRVRVEVSVDKORVWVKPMLMAI	
EcYgga	84	LASAEVMKQGRWKIIATMLAV	104
CgLysE	151	VLTWLNPNAYLDAFVFIGGVGAQYGDTGRWIFAAGAFAASLIWFPLVGFG	200
EcYgga	105	.TWLNPHVYLDTFVVLGSLGGQLDVEPKRWFALGTISASFLWFFGLALL	152
CgLysE	201	AAALSRPLSSPKVWRWINVVVAVVMTALAIKLMLMG236	
EcYgga	153	AAWLAPRIRTAKAQRIINLVVGCVMWFIALQLARDGIAHAQALFS 197	



Figur 3



Figur 4

<b>*</b>				* * *	* * *	***************************************	14.	re 
-			 2.30			 - 15°		•
	9.4				1			
					•			•
	• •							
	•							
		•						•
							-	
	•							*
								•
						•	~	
		•						
		* * * * *						
		* * *						
-								•
		*						
					•			
		•						•
2								
						•		1
•								
· ·							meth's	e de la companya de l

# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C12N 15/31, C12P 13/08, C12N 1/21, C07K 14/34 // (C12N 1/21, C12R 1:15)

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/23597

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

3. Juli 1997 (03.07.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE96/02485

(22) Internationales Anmeldedatum:

18. December 1996

(18.12.96)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FL,

FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

195 48 222.0

22. December 1995 (22.12.95)

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls

Änderungen eintreffen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE];

Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VRLIJC, Marina [DE/DE]; Steinstrasser Allee 60, D-52428 Julich (DE). EGGELING, Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, D-52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]: Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter:

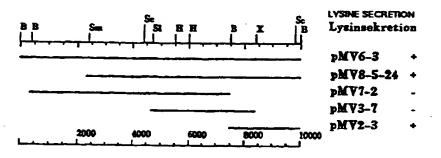
**FORSCHUNGSZENTRUM** JULICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, D-52425

Jülich (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 9. Oktober 1997 (09.10.97)

(54) Title: PROCESS FOR THE MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS BY BOOSTED ACTIVITY OF EXPORT CARRIERS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DURCH GESTEIGERTE AK-TIVITÄT VON EXPORTCARRIERN



#### (57) Abstract

The invention pertains to a process for the microbial production of amino acids. The process in question involves boosting the export carrier activity and/or export gene expression of a micro-organism which produces the desired amino acid. According to the invention, it was found that a single specific gene is responsible for the export of a given amino acid, and on that basis a process for the microbial production of amino acids, involving the controlled boosting of the export gene expression and/or export carrier activity of a micro-organism which produces the amino acid in question, has been developed for the first time. The boosted expression or activity of the export carrier resulting from this process increases the secretion rate and thus increases transport of the desired amino acid.

#### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrieraktivität und/oder die Exportgenexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgenexpression und/oder die Exportcarrieraktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Secretionsrate, so daß der Transport der entsprechenden Aminosäure erhöht ist.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Аппеніся .	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Osterreich	GR.	Georgien	NE	Niger
ΑU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	re.	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	rr	Ration	PT	Portugal
rj	Benin	JP	Japan	RO	Rumanien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kiryisestan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	De: sratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SC	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	u	Liechtenstein	SK	Slowakci
a	Côte d'Ivoire	LIK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litanen	TD	Tachad
CS	Tschechoslowakei	LU	Laxemburg	TG	Togo
cz	Tschechische Republik	LV	Lettland	T.)	Tadschikistan
DΕ	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldan	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda `
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
n	Finnland	MIN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanica	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malauri		

#### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interv nat Application No PC1/DE 96/02485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 1PC 6 C12N15/31 C12P13/08 //(C12N1/21, C07K14/34 C12N1/21 C12R1:15) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12P C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Relevant to claim No. Category ' Catation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages 1-48 MOL MICROBIOL, DEC 1996, 22 (5) P815-26, P.X ENGLAND, XP000675494 VRLJIC M ET AL: "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from Corynebacterium glutamicum." see the whole document JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1-7,10, X 21, vol. 177, no. 20, October 1995, 31-36, pages 5991-5993, XP000608713 41,43-48 WEHRMANN A ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF SEQUENCES ADJACENT TO DAPE OF CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM REVEALS THE PRESENCE OF AROP, WHICH ENCODES THE AROMATIC AMINO ACID TRANSPORTER" see the whole document -/--Patent family members are listed in annex. Хİ Further documents are listed in the continuation of box C. Special categories of cited documents: "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance invention 'E' carlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to filing date "L" document which may throw doubts on priority-clasm(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means ments, such combination being obvious to a person skilled document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "A" document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report 20.08.1997 8 August 1997 Name and mailing address of the ISA Authorized officer European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fatt (+31-70) 340-3016 Espen, J

Form PCT/LSA/216 (second sheet) (July 1992)

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern val Application No PCT/DE 96/02485

		PC1/DE 96/02485
(Continu	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
tegory *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
•	JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 78, no. 6, 1994, pages 420-425, XP000608032 IKEDA M ET AL: "TRANSPORT OF AROMATIC AMINO ACIDS AND ITS INFLUENCE ON OVERPRODUCTION OF THE AMINO ACIDS IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM" see the whole document	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48
	J BACTERIOL, JUL 1995, 177 (14) P4021-7, UNITED STATES, XP000675335 VRLJIC M ET AL: "Unbalance of L-lysine flux in Corynebacterium glutamicum and its use for the isolation of excretion-defective mutants." see the whole document	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48
<b>'</b>	WO 95 19442 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH ;MOECKEL BETTINA (DE); EGGELING LOTHA) 20 July 1995  see claims 1-23	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46
<b>Y</b>	EUR. J. BIOCHEM., vol. 202, 1991, pages 131-135, XP002037200 BRÖER S ET AL: "Lysine excretion by Corynebacterium glutamicum" see the whole document	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ormation on patent family members

Intern 121 Application No PCT/DE 96/02485

ed in search report	date	member(s)	date
0 9519442 A	20-07-95	DE 4400926 C EP 0739417 A	01-06-95 30-10-96

#### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr rates Aktenzeichen PC1/DE 96/02485

KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES PK 6 C12N15/31 C12P13/08 C12N1/21 C07K14/34 //(C12N1/21, C12R1:15) Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P C07K Recherchierte aber meht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evil. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kategorie\* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. MOL MICROBIOL, DEC 1996, 22 (5) P815-26, P,X 1-48 ENGLAND, XP000675494 VRLJIC M ET AL: "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from Corynebacterium glutamicum." siehe das ganze Dokument JOURNAL OF BACTERIOLOGY, X 1-7,10, Bd. 177, Nr. 20, Oktober 1995, 21, Seiten 5991-5993, XP000608713 31-36, WEHRMANN A ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF 41,43-48 SEQUENCES ADJACENT TO DAPE OF CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM REVEALS THE PRESENCE OF AROP, WHICH ENCODES THE AROMATIC AMINO ACID TRANSPORTER\* siehe das ganze Dokument -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Foruetzung von Feld C zu X X Siehe Anhang Patentiamshe \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber meht als besonders bedeutsam anzuschen ist Erfindung zugrundeliegenden Pranzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfinds kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffentlichung, die gezignet ist, einen Prioritätsampruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdahun einer anderen im Racherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden. Veröffentlichung von besonderer Bedeunung, die beauspruchte Erfindung-lann nicht als auf erfinderischer Tätiglesit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen deser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie susgeführt) \*O Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung, eine Besutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht Veröffentlichung, die wor dem internationalen Anmeidedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätudatum veröffentlicht worden ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des enterpationalen Recherchenberichts 20.08.1997 8. August 1997 Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Bewollmächtigter Bethensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 220 HV Rijsmyk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Fax (+31-70) 340-3016 Espen, J

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

tnerr nales Aktenzeichen
PCT/DE 96/02485

		PCI/DE 90	702403			
C.(Fortsetza	(Formetring) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN					
Categorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	nden Teile	Betr. Anspruch Nr.			
Y	JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Bd. 78, Nr. 6, 1994, Seiten 420-425, XP000608032 IKEDA M ET AL: "TRANSPORT OF AROMATIC AMINO ACIDS AND ITS INFLUENCE ON OVERPRODUCTION OF THE AMINO ACIDS IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM" siehe das ganze Dokument		1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48			
<b>f</b>	J BACTERIOL, JUL 1995, 177 (14) P4021-7, UNITED STATES, XP000675335 VRLJIC M ET AL: "Unbalance of L-lysine flux in Corynebacterium glutamicum and its use for the isolation of excretion-defective mutants." siehe das ganze Dokument		1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48			
<b>,</b>	WO 95 19442 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH ;MOECKEL BETTINA (DE); EGGELING LOTHA) 20.Juli 1995 siehe Ansprüche 1-23		1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46			
Y	EUR. J. BIOCHEM., Bd. 202, 1991, Seiten 131-135, XP002037200 BRÖER S ET AL: "Lysine excretion by Corynebacterium glutamicum" siehe das ganze Dokument		1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46			
			•			
·						

------

#### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..... die zur selben Patentfamilie gehören

Interny ales Aktenzeichen
PCT/DE 96/02485

lm Recherchenbericht	Datum der	Mitglied(er) der	Datum der
angeführtes Patentdokument	Veröffentlichung	Patentfamilie	Veröffendichung
WO 9519442 A	20-07-95	DE 4400926 C EP 0739417 A	01-06-95 30-10-96

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)